

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-F073

产品规格: 48T/96T

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 490 nm/440 nm, 发射波长 535 nm)

Elabscience®细胞内酸化率荧光法测试盒

Intracellular Acidification Rate Fluorometric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测细胞样本的细胞内环境的酸化率。

检测原理

细胞内酸化率是指细胞内环境 pH 的变化程度,是研究细胞功能的重要参数,恒定的细胞内 pH 水平是维持细胞正常代谢和功能不可或缺的条件,细胞内大多数生理生化反应,如细胞生长、钙调节、酶活性、受体介导的信号转导、离子作用、内吞作用、细胞粘附等,都在特定的 pH 范围内进行,因此细胞内 pH 调节与代谢之间存在着密切的关系,而准确的检测细胞内 pH 波动是了解细胞内代谢情况的重要途径。同时,研究细胞内 pH 调节与代谢之间的相互作用,有助于更好地理解细胞内的生化过程,并为相关疾病的治疗提供新的思路和方法。

本测试盒使用的探针具有双激发波长的特点,该探针在 490 nm 处有最大吸收,在 440 nm 处有一个等吸收点,通过计算两种激发波长的比值,就可检测细胞内 pH 的波动,比值波动越大,代表细胞内酸化率越高。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	盐溶液 (Saline Solution)	12 mL×1 瓶	24 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	探针 (Probe)	液体×1 支	液体×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明:试剂严格按上表中的保存条件保存,不同测试盒中的试剂不能混用。

试剂二使用前请先离心,以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：荧光酶标仪(激发波长 490 nm/440 nm，发射波长 535 nm)、37℃ 恒温培养箱

试剂：DMSO（二甲基亚砷）

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃。

② 高浓度探针储备液的配制：

取一支试剂二，加入108 μL DMSO（二甲基亚砷）混匀稀释，未用完的溶液，分装后-20℃可保存一个月。

③ 工作液的配制：

根据实验实际需求量，按照试剂一：高浓度探针储备液的体积比=99：1的比例，配制定量工作液（每孔需工作液200 μL），并充分混匀，工作液现配现用（探针在试剂一中不稳定，工作液配制后1小时内使用有效，建议细胞预处理完后再制备工作液）。

操作步骤

悬浮细胞: 根据实验设计进行细胞培养, 确保细胞健康且不会过度生长。收集细胞, 4°C, 500 × g 离心 5 min, 弃去上清液。

贴壁细胞: 根据实验设计进行细胞培养, 确保细胞健康且不会过度生长。去除细胞培养液, 用胰酶充分消化细胞, 加入含血清培养基终止消化后, 用生理盐水 (0.9% NaCl) 清洗并收集细胞, 4°C, 500 × g 离心 5 min, 弃去上清液。

① 按 2.5×10^6 个/mL 的细胞密度用工作液重悬细胞。

② 空白孔: 取 200 μL 工作液加入相应的酶标孔中。

测定孔: 取 200 μL 步骤①配制的细胞悬液加入相应的酶标孔中。

③ 振板 3 s, 立即使用荧光酶标仪分别于激发波长 490 nm, 发射波长 535 nm 和激发波长 440 nm, 发射波长 535 nm 处检测各孔荧光值, 分别记录为 $F1_{(490)}$ 和 $F1_{(440)}$ 。

④ 37°C 避光孵育 30 min, 孵育时间可在 10~60 min 之间进行调整, 孵育时长与细胞类型、探针浓度有关。

⑤ 振板 3 s, 用荧光酶标仪分别于激发波长 490 nm, 发射波长 535 nm 和激发波长 440 nm, 发射波长 535 nm 处检测各孔荧光值, 分别记录为 $F2_{(490)}$ 和 $F2_{(440)}$ 。

操作表

	空白孔	测定孔
工作液(μL)	200	--
细胞悬液(μL)	--	200
振板 3 s, 立即使用荧光酶标仪分别于激发波长 490 nm, 发射波长 535 nm 和激发波长 440 nm, 发射波长 535 nm 处检测各孔荧光值, 分别记录为 $F1_{(490)}$ 和 $F1_{(440)}$ 。		
37°C 避光孵育 30 min		
振板 3 s, 用荧光酶标仪分别于激发波长 490 nm, 发射波长 535 nm 和激发波长 440 nm, 发射波长 535 nm 处检测各孔荧光值, 分别记录为 $F2_{(490)}$ 和 $F2_{(440)}$ 。		

结果计算

细胞内酸化率计算公式：

$$\text{细胞内酸化率}(\%) = \frac{\Delta F1_{(490)} / \Delta F1_{(440)} - \Delta F2_{(490)} / \Delta F2_{(440)}}{\Delta F1_{(490)} / \Delta F1_{(440)}} \times 100\%$$

注解：

$\Delta F1_{(490)}$ ：孵育前测定孔在激发波长490 nm的初始绝对荧光值
(测定孔的 $F1_{(490)}$ - 空白孔的 $F1_{(490)}$)

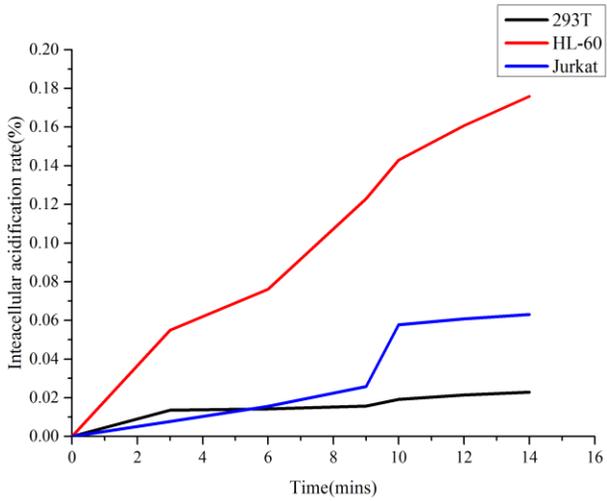
$\Delta F1_{(440)}$ ：孵育前测定孔在激发波长440 nm的初始绝对荧光值
(测定孔的 $F1_{(440)}$ - 空白孔的 $F1_{(440)}$)

$\Delta F2_{(490)}$ ：孵育后测定孔在激发波长490 nm的最终绝对荧光值
(测定孔的 $F2_{(490)}$ - 空白孔的 $F2_{(490)}$)

$\Delta F2_{(440)}$ ：孵育后测定孔在激发波长440 nm的最终绝对荧光值
(测定孔的 $F2_{(440)}$ - 空白孔的 $F2_{(440)}$)

附录1 关键数据

1. 293T、HL-60、Jurkat（相同细胞量）的细胞内酸化率



附录2 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
没有检测到荧光值 或荧光值低	细胞密度不够	增加细胞密度
	探针浓度不够	增加探针浓度
	孵育时长不够	适当增加孵育时间

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

